

#5



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

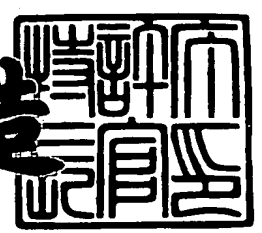
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 0 - 0 9 8 1 3 4

出 願 人
Applicant (s): サントリー株式会社

2 0 0 1 年 1 月 1 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 1 1 3 9 7 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 000687

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成12年 3月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府和泉市光明台 1 - 2 4 - 9

 【氏名】 北風 政史

【特許出願人】

 【識別番号】 000001904

 【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089705

 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 社本 一夫

 【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

 【識別番号】 100071124

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

 【識別番号】 100076691

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100092886

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 清

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 虚血性疾患の処置又は予防に用いる医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内 c G M P 産生を亢進し得る物質であって、梗塞領域を縮小させる作用を有する物質を有効成分とする虚血性心疾患の処置又は予防に用いる医薬組成物。

【請求項 2】 虚血性心疾患の処置における虚血再灌流障害を抑制するための請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】 虚血性心疾患が心筋梗塞である場合の請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】 有効成分である物質がナトリウム利尿ペプチド又はその塩であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 記載の医薬組成物。

【請求項 5】 ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチドであることを特徴とする請求項 4 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内 c G M P 産生を亢進し得る物質を有効成分として含有する、細胞の虚血性壊死により生じる梗塞領域を縮小させるための医薬組成物に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

近年、社会の高齢化に伴い虚血性疾患が大きな問題になっている。特に循環器疾患である心臓疾患のうち心臓血管障害により生じる心筋梗塞は、冠状動脈の閉塞または急激な血流減少により心筋細胞の虚血性壊死を生じて心機能低下をもたらす生死にかかわる重篤な疾患である。心筋梗塞の直接的原因は、冠状動脈硬化や冠状動脈内の血栓形成による心筋への血流減少又は停止である。結果的に急性

又は慢性の心機能不全が惹起される。

【 0 0 0 3 】

虚血性心疾患の治療においては、閉塞した冠状動脈を血管内挿入バルーンにより拡張させたり、ステントを血管内に挿入することにより血流を確保したり、血管内に生じた血栓を血栓溶解剤により溶解除去する方法が採用されている。このような治療においては、冠状動脈内に血流が再開されるに伴いCa過負荷やフリーラジカルが発生し、細胞の壊死領域が広がることが知られているが、このような虚血再灌流障害の発生を予防するのは困難であり、有効な治療方法が定まっていないのが現状である。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内cGMP産生を亢進し得る物質を有効成分として含有する、細胞の虚血性壊死により生じる梗塞領域を縮小させるための医薬組成物を提供する。詳しくは虚血性疾患の処置における虚血再灌流障害を抑制するための医薬組成物を提供する。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

ナトリウム利尿ペプチドであるhANPは、利尿作用及び血管平滑筋細胞において弛緩作用のセカンドメッセンジャーと考えられているcGMPの産生を亢進して血管（例えば、冠動脈）の弛緩を惹起することにより血圧降下作用を有するため心不全の症状を軽減する対症療法剤として使用されている。

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、更にナトリウム利尿ペプチドの特性について研究を行ったところ、当該ペプチドが、虚血再灌流を伴う急性心筋梗塞モデルにおいて生じる梗塞領域を縮小させうることを初めて見だし本発明を完成した。

【 0 0 0 7 】

即ち、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内cGMP産

生を亢進し得る物質であって、梗塞領域を縮小させる作用を有する物質を有効成分とする心筋梗塞等の虚血性疾患の処置又は予防に用いる医薬組成物に関する。なお、本発明において梗塞領域を縮小するとは梗塞領域の拡大を抑制することを意味する。

【 0 0 0 8 】

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内 c G M P 産生を亢進し得る物質であって、梗塞領域を縮小させる作用を有する物質を、虚血再灌流障害を抑制するために虚血性疾患患者に投与することからなる虚血性疾患の処置又は予防方法に関する。

【 0 0 0 9 】

ある物質が本発明に係る虚血性疾患の処置又は予防に用いる医薬組成物の有効成分となりうるか否かは、公知の方法、例えば、Minamitake, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 971-978 (1990); Furuya, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 201-208 (1990); Furuya, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 927-931 (1991); 日高寿範ら, 日薬理誌, 101, 309-325 (1993) 等に記載される方法、を用いて調べることが出来る。

【 0 0 1 0 】

本発明に係る医薬組成物の有効成分として、好ましいものはナトリウム利尿ペプチドであり、その中でも、心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) および脳性利尿ペプチド (B N P) が好ましく、最も好ましいのは A N P である。

【 0 0 1 1 】

A N P としては、28個のアミノ酸よりなるヒト由来 A N P (human atrial natriuretic peptide; h A N P、Kangawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 118, p131, 1984) (配列番号：1) やラット由来 A N P (Kangawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 121, p585, 1984) (配列番号：2) を用いることができるが、本発明に係る有効成分のペプチドとしては、A N P のリング構造 (C y s に基づくジスルフィド結合の形成) およびリング構造に続く C 末端部を有するペプチドであればよい。そのようなペプチドとしては A N P の 7 - 2 8 位のアミノ酸残基を有するペプチド (配列番号：3) が挙げられる

。更にカエル由来のANP（配列番号：5）も挙げることができるが、上記のうちでも特にヒト由来ANP（hANP）が好ましい。

【0012】

BNPとしては、上記ANPと同様にジスルフィド結合の形成を伴う32個のアミノ酸よりなるヒトBNP（Sudoh et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 159, p1420, 1989）（配列番号：4）等が挙げられる。ブタBNP（配列番号：6）、ラットBNP（配列番号：7）等ヒト以外のBNPも種々知られており、同様に使用できる。更にニワトリBNP（配列番号：8）も挙げられる。

【0013】

CNPとしては、上記ANP及びBNPと同様にジスルフィド結合の形成を伴う22個のアミノ酸よりなるブタ由来CNP（Sudoh et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 168, p863, 1990）（配列番号：9。ヒト及びラットも同じアミノ酸配列を有する）やニワトリ由来CNP（Arimura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 174, p142, 1991）（配列番号：10）、又はカエル由来CNP（Yoshihara et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 173, p 591, 1990）（配列番号：11）等を挙げることができる。

【0014】

更に、公知のナトリウム利尿ペプチド（例えば上記ヒト由来ANP；hANP）のアミノ酸配列に基づき、当業者であれば適宜公知の方法により、当該配列中のアミノ酸残基に欠失、置換、付加、挿入等の修飾及び／又は化学的修飾を施すことが可能であり、得られた化合物がANPの受容体に作用し、cGMP産生を亢進する活性を有する化合物であることを確認することができる。従って、そのような活性を有する誘導体は本発明の有効成分に含まれる。更に、本発明に係る物質としては、ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内cGMP産生を亢進し得る物質であれば上記ペプチドに限定されるものではなく、非ペプチドの化合物であってもよい。

【0015】

本発明に係る医薬組成物の有効成分は、遊離型であっても、その医薬的に許容し得る塩であってもよい。無機酸との塩としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸と

の塩が挙げられ、あるいは有機酸との塩としては、例えばギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、クエン酸等との酸付加塩として用いることができる。塩は、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態であってもよい。

【 0 0 1 6 】

有効成分は、公知の薬理学的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤等と混合して医薬に一般に使用されている投与方法、例えば、経口投与方法、又は静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好ましい。本発明の医薬組成物は、例えば、有効成分を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、安定剤等と、適宜混和することにより製造することができる。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤などの経口投与用の固形剤を製造する場合、添加剤として、例えば、(1) 乳糖、デンプンまたは結晶セルロースなどの賦形剤、(2) ヒドロキシプロピルセルロースやポリビニルピロリドンのような結合剤、(3) デンプン、クロスカルメロースナトリウムのような崩壊剤、(4) マクロゴールやクエン酸トリエチルのような可塑剤、(5) ステアリン酸マグネシウムやタルクのような滑沢剤、(6) ヒドロキシプロピルメチルセルロース、オイドラギットなどのコーティング基剤、(7) 白糖やマンニトールのような矯味剤の他、矯臭剤、着色剤などを用いることができる。

【 0 0 1 7 】

また、注射剤、点眼剤または経鼻剤を製造する場合は、添加剤として、(1) 塩ナトリウム、D-マンニトール、D-ソルビトールなど等張化剤、(2) 塩酸、クエン酸などのpH調整剤、(3) クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸などの緩衝剤、(4) 塩酸プロカインなど無痛化剤の他、安定化剤や界面活性剤を添加することができる。また有効成分の安定性などを考慮して、用時溶解または用時懸濁して使用する製剤とするか、または液剤とするかを選択することができる。

【 0 0 1 8 】

軟膏剤、パップ剤といった外用剤の製造には、(1) 流動パラフィン、ワセリン、親水軟膏などの基剤、(2) ポリソルベート80、トラガントなどの乳化剤、(3)

）安息香酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸プロピルなどの保存剤、(4) 塩酸プロカインなど無痛化剤の他、安定化剤や界面活性剤を添加することができる。

【0019】

有効成分がナトリウム利尿ペプチドの場合、経口投与では消化管内で分解を受けるため、この投与方法は一般的には効果的ではないが、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分であるペプチドをリポソーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は座剤、舌下錠といった形態で投与することができる。

【0020】

本発明の医薬組成物の投与量は、心筋梗塞患者又は心筋梗塞を起こすと予想される患者の年齢、体重、症状の程度および投与経路などによっても異なるが、有効成分がナトリウム利尿ペプチドの場合、持続静脈内投与においては $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min} \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の範囲で投与することができ、 $0.025 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min} \sim 0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で投与するのが好ましい。

【0021】

【実施例】

以下の実施例により、ナトリウム利尿ペプチドであるhANPが、虚血再灌流を伴う急性心筋梗塞モデルにおいて生じる心筋梗塞領域を縮小することを示す。

方法

体重 $14 \sim 23 \text{ kg}$ のビーグル成犬12頭をペントバルビタールナトリウムで麻酔開胸し、hANP ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$)を左冠動脈前下行枝(LAD)内に10分間持続投与(i.c.投与)した後、LADを90分後に再灌流するまで完全に閉塞して虚血状態にした。再灌流の10分前から1時間にわたり、再度hANP ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$)をLAD内に持続投与した。6時間の再灌流後、エバンスブルー染色によって梗塞危険領域を評価し、TTC染色によって梗塞領域を評価した(A群:5頭)。また、虚血80分時に、心内膜側副血流量をマイクロ

スフェア法により測定した。

【 0 0 2 2 】

h A N P の代わりに生理食塩水を L A D 内に投与した群を対照群（B 群：7 頭）として設けた。

【 0 0 2 3 】

実験のプロトコールを図 1 に示す。図中、C P P は冠灌流圧 (coronary perfusion pressure) を示し、試験開始前には L A D 内を血液が流れており、その後 9 0 分間血流を途絶させ、再度血流を再開し 3 6 0 分目に試験を終了したことを示している。

【 0 0 2 4 】

また、本発明に係る h A N P の効果に対する虚血中の心内膜側副血流量、平均血圧及び心拍数の関与の有無を調べるために、それらの事項についても測定した。

結果

(1) 各試験群の左心室の心筋梗塞危険領域の大きさを図 2 に示す。試験群の間では心筋梗塞危険領域の大きさに有意差はなかった。

【 0 0 2 5 】

(2) 虚血再灌流を伴う急性心筋梗塞モデルにおいて、h A N P 投与により心筋梗塞領域は縮小した。即ち、図 3 に示すとおり、対照群（B 群）の心筋梗塞領域は、心筋梗塞危険領域の $41 \pm 3\%$ であるのに対して、h A N P 投与群（A 群）では $21 \pm 5\%$ と有意に縮小した（図 3）。

【 0 0 2 6 】

(3) 各群間において、虚血中の心内膜側副血流量に差がないことを確認した。また、各群における心拍数及び平均血圧の変動を、試験開始 5 分後、1 0 分後、虚血開始から 9 0 分後及び再灌流開始から 3 6 0 分後 の各時点で測定した結果、h A N P 投与により平均血圧、心拍数に変化が生じないことも確認した。

【 0 0 2 7 】

上記の事実から、ナトリウム利尿ペプチドの投与により虚血性疾患の処置にお

ける虚血再灌流障害が抑制されることが確認され、これにより心筋梗塞領域の縮小効果はナトリウム利尿ペプチドの心筋梗塞領域を縮小させる作用によるものであることが確認された。

【 0 0 2 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> サントリー株式会社

<120> 虚血性疾患の処置又は予防に用いる医薬組成物

<130> 000687

<160> 11

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> ヒト

<220>

<223> A N P

<400>

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

25

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> ラット

<220>

<223> A N P

<400>

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

25

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> カエル

<220>

<223> A N P

<400>

Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly

1

5

10

15

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> ヒト

<220>

<223> B N P

<400>

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp

1

5

10

15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His

20

25

30

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> カエル

<220>

<223> A N P

<400>

Ser Ser Asp Cys Phe Gly Ser Arg Ile Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser

1

5

10

15

Gly Met Gly Cys Gly Arg Arg Phe

20

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> ブタ

<220>

<223> B N P

<400>

Ser Pro Lys Thr Met Arg Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp

1

5

10

15

Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Arg Tyr

20

25

30

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

<213> ラット

<220>

<223> B N P

<400>

Ser Gln Asp Ser Ala Phe Arg Ile Gln Glu Arg Leu Arg Asn Ser Lys

1

5

10

15

Met Ala His Ser Ser Ser Cys Phe Gly Gln Lys Ile Asp Arg Ile Gly

20

25

30

Ala Val Ser Arg Leu Gly Cys Asp Gly Leu Arg Leu Phe

35

40

45

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> ニワトリ

<220>

<223> B N P

<400>

Met Met Arg Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Ile Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ser Leu Ser Gly Met Gly Cys Asn Gly Ser Arg Lys Asn

20

25

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> ヒト、ブタ、ラット

<220>

<223> C N P

<400>

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> ニワトリ

<220>

<223> CNP

<400>

Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> カエル

<220>

<223> CNP

<400>

Gly Tyr Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala

1

5

10

15

Phe Ser Gly Leu Gly Cys

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例の急性心筋梗塞モデルを説明する図である。虚血再灌流の様子及び 1) 生理食塩水投与群 (B 群)、2) h A N P 投与群 (A 群) における投与の様式が示されている。

【図 2】 図 1 の急性心筋梗塞モデルにおける各群の心筋梗塞危険領域を示す図である。

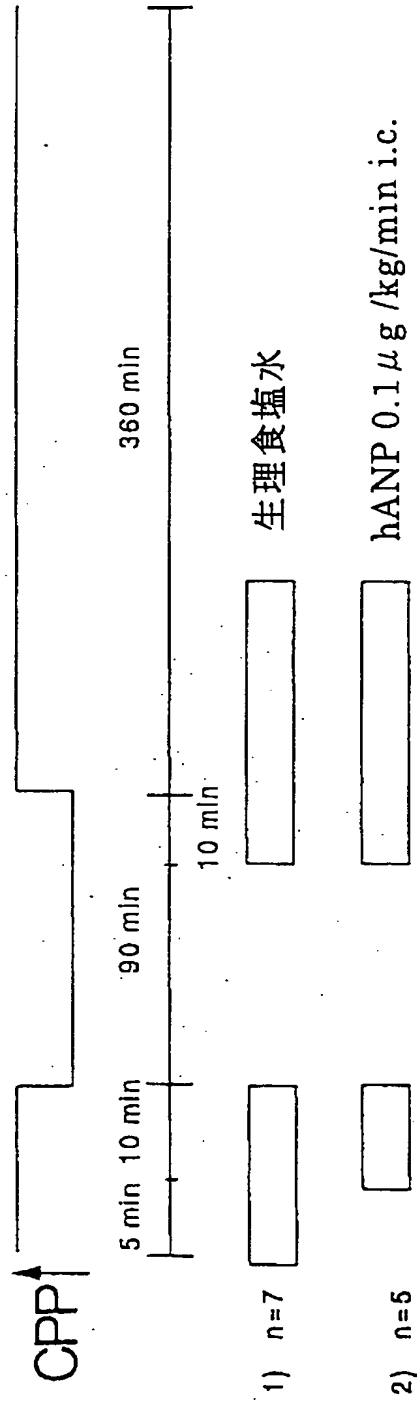
【図 3】 各群の心筋梗塞危険領域に対する心筋梗塞領域の割合 (%) を示す図である。

【書類名】 図面

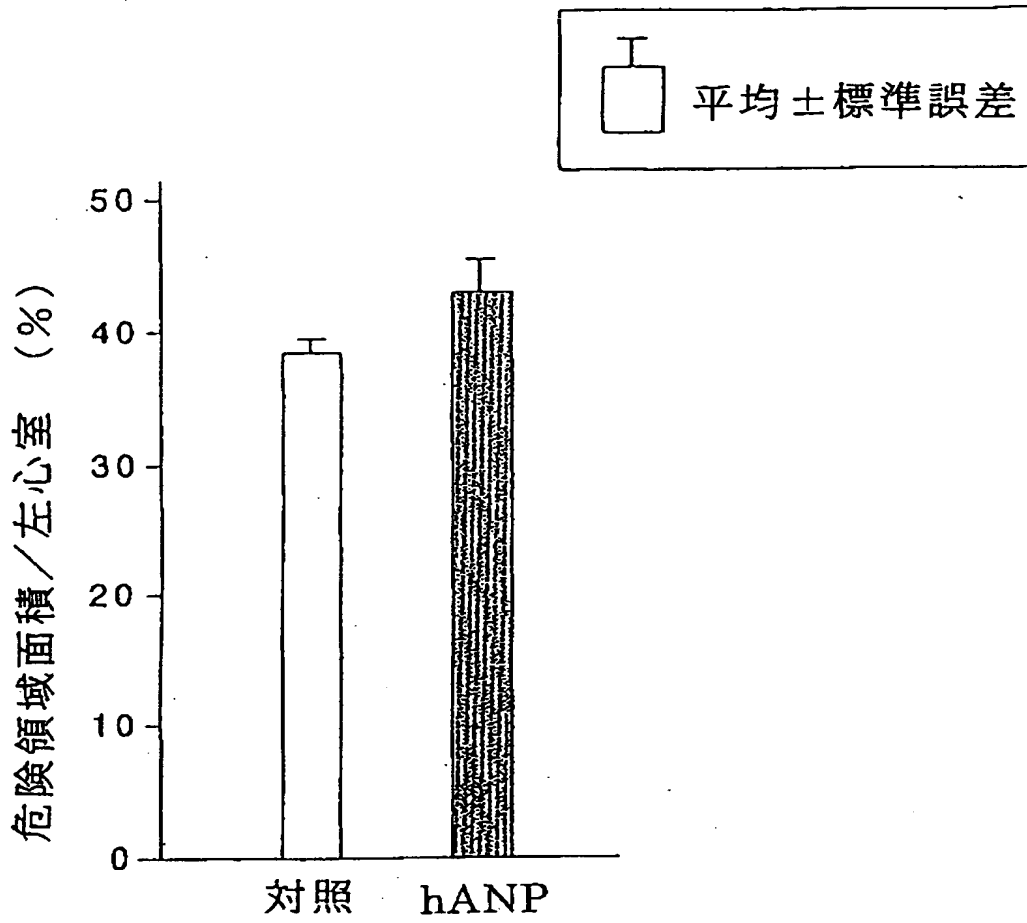
【図 1】

実験プロトコール

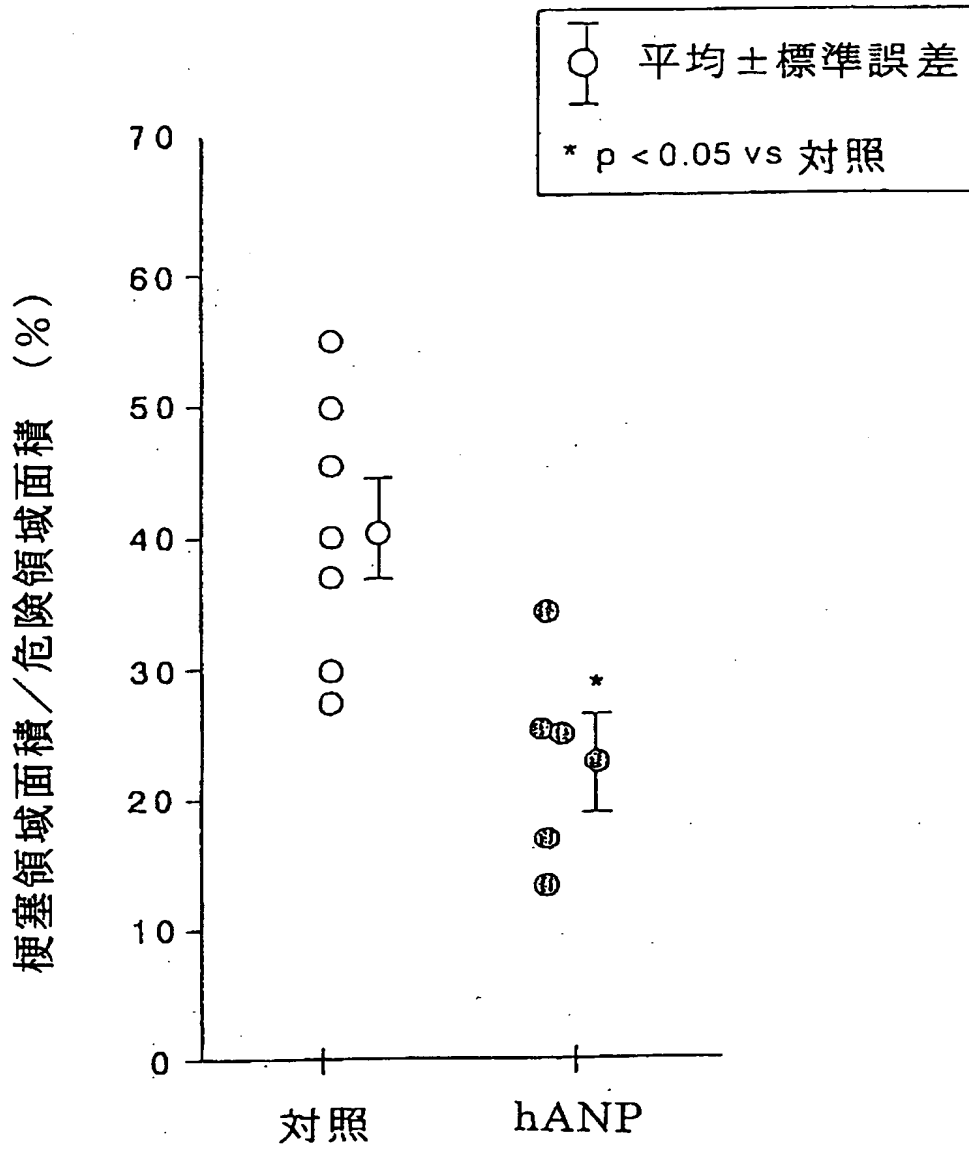
・ 12 頭の開胸犬



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞の虚血性壊死により生じる梗塞領域を縮小させるための医薬組成物、特に虚血性疾患の処置における虚血再灌流障害を抑制するための医薬組成物を提供する。

【解決手段】 ナトリウム利尿ペプチド受容体に作用し、細胞内 c G M P 産生を亢進し得る物質であって、梗塞領域を縮小させる作用を有する物質（好ましくはナトリウム利尿ペプチド）を有効成分として含有する虚血性疾患の処置又は予防に用いる医薬組成物。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日	1990年 8月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名	サントリー株式会社